

[原 著]

結核菌群リファンピシン耐性遺伝子同定キット「ジェノスカラー・Rif TB」の
実用性評価とリファンピシン耐性結核状況の推測吉田志緒美¹⁾・富田元久²⁾・木原実香²⁾・吉川裕之³⁾¹⁾独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター²⁾独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床検査科³⁾独立行政法人国立病院機構刀根山病院 臨床検査科

(平成23年8月3日受付 平成23年12月24日受理)

今回、われわれはジェノスカラー・Rif TB (Line probe assay: LiPA) の実用性と結果から推測されるリファンピシン (RFP) 耐性結核状況の信頼性を検討した。当センターに新規入院された患者由来の塗抹陽性かつ培養陽性であった753検体のうちLiPAで十分な増幅を確認できた750検体についてLiPAと薬剤感受性検査の結果を比較検討したところ、LiPAでRFP感受性とされた715検体由来715株のすべてと耐性とされた35検体由来の35株のうち33株がMGIT-ASTの結果と一致した。RFP耐性株のうち6株がRFP単独耐性、27株が多剤耐性結核菌 (MDR-TB) となり、LiPAのMDR-TB的中率は77.1% (27/35)、MDR-TBを陽性と判定する感度は100%となった。同キットは適切な操作を行った場合でも、いくつかの耐性遺伝子変異を忠実に反映できなかった場合が見られたが、喀痰以外の希少な臨床材料に対しても明確なバンドパターンが認められた。したがって、同キットの検出限界を把握し、臨床症状や複数の検査結果から総合的に判断する必要があるものの、臨床現場におけるMDR-TBスクリーニングとしての有用性が示唆された。一方、LiPAは4年間の運用成績から地域における結核菌のRFP耐性パターンやその頻度の把握と耐性結核状況の推測が可能であった。当センターにおける同時期の結核統計データと比較してもほぼ変化はなく、疫学データとして信頼性はあると思われた。

Key words: 結核菌群, リファンピシン, *rpoB* 遺伝子, Line probe assay, MDR-TB

序 文

2009年におけるわが国の結核患者の発生はこれまで24,000人以上であり、罹患率は10万対19.0と前年と比べて約2%の減少にとどまる¹⁾。働き盛りの感染性のある結核患者では受診の遅れ (2カ月以上の割合) が大きく、新登録肺結核菌培養陽性患者による登録時の薬剤感受性検査結果では、多剤耐性率 (初回・再治療含む) は0.8% (56/6,920) であり、特に20~40歳代の年代層に耐性結核患者が目立つ¹⁾。治療困難な多剤耐性結核菌 (MDR-TB) の感染率は2002年の結核療法

研究協議会が実施した全国調査によると未治療結核患者で0.7%、既治療患者で9.8%、初回・再治療を合わせて1.9% (60/3,122) となっている²⁾。また、2009年における世界のMDR-TB患者は結核新規登録患者940万人の3.3%であると推定され (WHO推計)³⁾、わが国は中蔓延国ではあるが先進国の中では依然高い。しかも地域的に耐性結核菌の増加が懸念されている高蔓延地域に囲まれている立場からも、MDR-TBの早期発見と適切な治療は重要な意味をもつ。

現在わが国で標準とされている抗結核薬の感受性検査法は、ある結核菌集団の中でどれくらいの割合で耐性菌が存在するのかを評価する比率法である。しかし、同法を固形培地で行った場合、一般的に培養に4~6週間の時間がかかり、一方、液体培地で行った場合は、迅速性に優れている反面、複数菌の混在を確認できないため、事前に固形培地もしくは寒天培地上でコロニー形状の確認を行わなければならない。さら

著者連絡先: (〒591-8555) 堺市北区長曾根町1180
独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター
吉田志緒美
TEL: 072-252-3021
FAX: 072-251-1372
E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp

に、この株がMDR-TBと判定された場合、2次抗結核薬の感受性判定としてさらに他の薬剤感受性検査を行わなければならない。MIC測定による細菌学的評価に基づいた薬剤感受性検査は時間を短縮できるが、感受性判定において、細菌学的情報から臨床的効果を推測する比率法で用いられるブレイクポイントとは完全には一致しないため、総合的な判断が必要となる。

結核菌の薬剤耐性は染色体上の変異によってのみ獲得すると考えられている。これまで明らかになっている抗結核薬の薬剤耐性と特定の遺伝子上変異の間には高い相関性が報告されており、迅速に薬剤感受性が判定できるとして、さまざまな遺伝子検査法が開発されている。その一つがPCRとリバーシハイブリダイゼーションを取り入れたラインプローブアッセイ (LiPA) であり、同手法を応用したキット「ジェノスカラー・Rif TB」はその高い感度と特異度が多数報告されている⁴⁻⁷⁾。当センターでは同キットを2007年からルーチン検査に導入し、喀痰からの直接検出によるリファンピシン (RFP) 耐性遺伝子迅速検出法として用いているが、実際、患者の状態によって採取できる検体に限りがあることから、喀痰以外の希少かつ多様な材料についてのLiPAの有用性を確認する必要があった。また、ルーチン検査として運用する際に、大量の臨床検体に対して安定したデータを長期に供給し続けられることが精度管理上重要であり、特に抗酸菌検査は検査結果が患者個人やその周辺に与える公衆衛生上の影響が大きいことから、検査の信頼性に十分配慮しなければならない。そのためには、集団感染の偏りを最小限にし、より現状に近い結核菌の分離頻度や疫学情報を反映させるだけの中長期的な研究期間の設定が必要であることから、今回の研究期間を4年間とした。しかも、当センターは、結核罹患率の全国トップでありクラスター形成率の高い医療圏を抱える大阪府下の結核拠点病院の一つで、地域の臨床サーベイランスを担う役割も有している。したがって、同キットの運用により地域におけるRFP耐性結核状況の推測が可能であるかを検討した。

材料と方法

対象

2007~2010年の間、当センターに新規入院した患者由来で集菌塗抹検査 (蛍光法) 陽性、BACTEC MGIT960 システム (日本ベクトン・ディッキンソン) と小川KY培地 (セロテック) を用いて培養検査陽性となり薬剤感受性検査を実施して耐性もしくは感受性の結果を得ることができた753検体のうちLiPAで十

分な増幅を確認できた750検体を対象とした。本研究では、LiPAは塗抹陽性検体で高感度を示すのに対して、塗抹陰性検体では低下するという報告や^{8,9)}、PCR増幅反応は対象とする検体の質や菌量の差により効率が低下する報告^{10,11)}から、塗抹陽性、培養陽性の喀痰検体のみを対象とした。これらの検体のうち、アンプリコア・マイコバクテリウムツベルクローシス (ロシュ・ダイアグノスティックス) による増幅産物が得られなかった4検体を除く746検体は結核菌群と同定された。

対象検体はすべてプレソルブ (日水製薬) で溶解、均質化した後、NaOH法により前処理を行いMGITにて培養された。得られた750菌株はキャピリアTB (タウンズ) を用いて結核菌群と同定された。また、複数菌の混在否定は、富田らが考案したPNBA¹²⁾上の発育と小川培地上のコロニー性状の確認で行った。

薬剤感受性検査

本研究では、液体培地を用いたBACTEC MGIT960 AST (MGIT-AST: 日本ベクトン・ディッキンソン) を薬剤感受性検査の標準とし、培養陽性となった検体に対してRFPおよびイソニアジド (INH) の感受性判定を行った。RFP耐性と判定された株に対しては小川比率法であるウェルバック-S (日本ビーシージー) を行い、両薬剤感受性検査とLiPAの結果に乖離が見られた場合にのみブロスミックMTB-1 (極東製薬工業) を用いたMIC測定を行った。

LiPA

検体はアンプリコアのDNA抽出液を用い、ジェノスカラー・Rif TB増幅試薬キットの増幅ステップ1における塩化マグネシウム溶液を除去した方法で、総量50 μ l中DNA抽出液を20 μ lに増量し、増幅を行った。増幅ステップ2以降は取扱説明書に準拠してPCRを実施した。得られた増幅産物は自動ハイブリ装置 (マルチプロットNS-4800) を用いてハイブリダイズを行った。

rpoB 遺伝子のシーケンス解析

RFP耐性結核菌に対して、Kimらの方法¹³⁾に準じてシーケンス解析を行った。プライマーセットはMF (5'-CGACCACTTCGGCAACCG-3') とMR (5'-TCGATCGGGCACATCCGG-3') を用い、hot spotの81 bpを含む306 bpの*rpoB* 遺伝子領域を3,500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。得られたデータはBlast解析により、データベースと比較検討した。

結 果

希少検体に対する LiPA の性能

750 検体中 50 検体が喀痰以外の希少検体であり、これらはすべて喀痰材料と同様に良好な LiPA の結果が得られた (Table 1)。

LiPA と薬剤感受性検査との比較

750 検体中 33 検体は LiPA ならびに薬剤感受性検査 (MGIT-AST) で RFP 耐性、それらのうち 27 検体の由来株は MGIT-AST で RFP, INH ともに耐性なり MDR-TB と判定され、残り 6 検体由来株は MGIT-AST で RFP のみ耐性となり単独耐性菌と判定された。これらの由来株はすべてウェルパック-S でも同様の結果であった。一方、715 検体は LiPA で RFP 感受性、由来株は MGIT-AST でも RFP, INH 感受性とされた。残る 2 検体のみ LiPA で RFP 耐性、MGIT-AST で RFP, INH 感受性と判定され、これらの 2 検体のうち 1 検体 (103) の由来株はウェルパック-S で RFP 耐性、INH 感受性となった。しかし、残る 1 検体 (71) の由来株はウェルパック-S でも RFP, INH とも感受性となったため、シングルコロニー化した 2 菌株を用いて MIC 測定した結果、RFP は 0.06 と 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, INH は 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の値を得られた (Table 2)。したがって、検体 (71) 由来株は

比較的高値の MIC をもつ RFP 感受性株と考えられた。

rpoB シークエンス解析結果

上記菌株 (71) と (103) は順に変異領域 (コドン)¹⁴511 と 533 に変異をもち、アミノ酸変異を伴う RFP 耐性結核菌であることが確認された。LiPA で RFP 耐性とされた 33 検体は LiPA で単独のプロープにのみ変異を認めたが、2 検体はシークエンス解析で複数の変異が認められた。コドン 511 に欠損と 526 に変異 [コドン 526 の His が Leu ($\Delta S4$)] を認めた 1 検体 (648) は $\Delta S4$ のみをもつパターンとして検出され、検体 (761) はコドン 513 の Gln が Alg (同キットでは未報告の $\Delta S1$ パターン)、コドン 526 の His が Pro ($\Delta S4$) となる変異を有していたが $\Delta S1$ パターンを示し、遺伝子変異を認めた領域に相当する LiPA プローブに正確な発色パターンを呈さなかった (Table 3)。一方、Bartfai ら¹⁵ が同キットで検出できなかったコドン 513 の Gln が Lys に変異をもつ 1 検体は、今回 $\Delta S1$ パターンを示した。

考 察

RFP 耐性は結核菌の RNA 合成酵素 β -サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子上の点突然変異と強い相関

Table 1. Results of LiPA compared with culture in detecting MTBC in primary clinical specimens*

Clinical specimen	No. of specimens	LiPA pattern(s) (No. of specimens)
Sputum	700	S(668), $\Delta S1$ (3), $\Delta S4$ (4), $\Delta S5$ (2), R2(1), R4b(2), R5(20)
Gastric aspirate	26	S(25), R4b(1)
BAL	10	S(9), R5(1)
Abscess	4	S(3), R5(1)
Pleural fluid	2	S(2)
Biopsy specimens**	5	S(5)
Urine	3	S(3)
Total	750	

*: MTBC excludes 3 specimens containing substances inhibitory to the polymerase chain reaction (PCR) or PCR-equivocal results by LiPA. LiPA, line probe assay; MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* complex

** : Biopsy specimens obtained from miscellaneous sites including lung, lymph node, and pleura.

Table 2. Performance of LiPA compared with the MGIT-AST as a reference method for 750 *M. tuberculosis* strains

LiPA result	No. of isolates with the following MGIT-AST ^a result	
	Susceptible	Resistance
Wild	715	0
Mutation	2 ^b	33

^a: Drug concentrations, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for RFP

^b: One isolate (71) was susceptible, but other isolate (103) was resistance by proportion method based Ogawa-egg medium (Welpak-S) in Table 3.

Table 3. Discordant results of MTBC isolates by the susceptibility, LiPA, and DNA sequencing of the 306 bp region of the *rpoB* gene

Sample specimens	Drug susceptibility testing (MGIT-AST)		LiPA pattern	<i>RpoB</i> mutation(s): Allele ^{***} /Amino acid change
	Rifampicin	Isoniazid		
71	Susceptible*	Susceptible	ΔS1	511 (ctg→ccg)/Leu→Pro
103	Susceptible**	Susceptible	ΔS5	533 (ctg→ccg)/Leu→Pro
648	Resistance	Resistance	ΔS4	511 deletion/Leu; 526 (cac→ctc)/His→Leu
761	Resistance	Resistance	ΔS1	513 (caa→cga)/Gln→Arg; 526 (cac→ccc)/His→Pro

*: Susceptible by MGIT-AST and proportion method of Ogawa-egg medium (Welpak-S), but the MIC of 2 single colonies from the isolate showed 0.06 and 0.5 μg/ml

** : Susceptible by MGIT-AST, however, resistance by Welpak-S

***: *E. coli* numbering system for β-subunit of the RNA polymerase¹⁴⁾

があることがMusser¹⁶⁾により報告され、*rpoB*遺伝子のコドン507からコドン533までの27個のアミノ酸(81 bp)領域がRFP耐性株の約95%の変異を有していたことからhot spot領域と定義している。このhot spot領域の変異を検出するLiPAはストリップ上の結核菌群特異的のプロープの発色による結核菌群の同定と、5種類の野生型プロープ(S1~S5)と4種類の変異型プロープ(R2, R4a, R4b, R5)の発色により結核菌群の同定とRFP感受性判定を同時に行うことができる。しかも喀痰検体からの判定も可能であり、治療方針を早期に決定できるとされている。

LiPAの実用性評価

本研究では喀痰以外の検体に対してもLiPAパターンが得られ、同キットの広い汎用性が示された。LiPAの操作はおおむね簡便で、結果の目視判定も容易であったが、適切な操作を行っても、複数の変異が存在する2株の発色パターンが正しく得られなかった。複数の変異をもつ場合、治療過程において生じる菌のポピュレーションの変化に伴う各変異をもつ菌の混在 (genetic heterogeneity) か、2種類の変異を併せ持つモノクローナルな菌が存在している状態が考えられる。一般的に薬剤耐性結核の患者は過去に治療歴があり、以前の治療が不適切である場合が多いが、今回2名とも過去に結核の既往歴のない患者であることと、シークエンスで得られた変異に対応した塩基が共にシングルピークであったことから、高いクロナリティーをもつ単一の菌株である可能性が高いと考えられた。しかしながら、LiPAのこのような現象は他の報告からも散見でき^{15,17)}、いくつかのまれな変異について同キットは検出確認が十分にされていない現状から、今後もシークエンス解析の変異パターンと実際の発色パターンが異なるケースが検出されると思われる。一

方、LiPAのプロープS5領域に変異が存在する場合(ΔS5)にプロープR4a, R4bに弱陽性反応が見られることがあったが、これはプロープS4とS5に対応するDNA領域の2次構造によるものとされている(LiPA取扱説明書参照)。われわれは、このような同キットの検出限界を把握したうえで、臨床症状や複数の検査結果を考慮して総合的に判断をする必要がある。

さらに、LiPAの導入によって入院の早期段階にアンプリコアのデータと突き合わせることができ、結核菌群同定のチェック機能が強化され、肺結核診断における同定検査の信頼性が増した。特に、アンプリコアで増幅不能となった4検体はLiPAでRFP感受性結核菌という情報が得られた。つまり、複数の検査法を併用し補完することで、今までunknownなままの症例に対して、より正確な情報が得られるとともに効果的な治療を迅速に遂行できることが確認された。また、MDR-TBなど薬剤感受性検査培地上で十分な発育を認められないような場合においてもRFPの感受性判定が可能であり、検査精度の向上も期待できる。

本邦最大の感染症を引き起こす病原体である結核菌の検査法を評価するには、病原体サーベイランスによる疫学状況を把握したうえで行うことが重要である。WHOは、臨床分離株サーベイランスの統計から、RFP単独耐性結核菌の割合が3%以上を認める地域においてLiPAのMDR-TBのスクリーニング信頼度は低下する、と報告しているが¹⁸⁾、本研究期間中に分離されたすべての結核菌1,550株のうち、MGIT-ASTでRFP単独耐性結核菌と判定された株は6株(0.4%)であった。今回対象とした750検体に対するLiPAのRFP感受性的中率は100%(715/715)、RFP耐性的中率は94.3%(33/35)であった。また、LiPAはMDR-TB27検体すべてをRFP耐性と判定できたことから、同

キットの高い感度が認められ、MDR-TBスクリーニングの信頼性が示唆された。

RFP耐性結核状況の推測

解析期間(2007~2010年)中、当センターで分離同定された結核菌で薬剤感受性検査を実施できた1,550株のうち、MDR-TBであった株は58株であり(3.7%)、RFP単独耐性結核菌を合わせてRFP耐性結核菌は64株(4.1%)であった。今回LiPAによりRFP耐性と確認できた比率(4.7%: 35/750)と比較してもほぼ同程度であったことから、LiPAで示された結果は当センター周辺地域のMDR-TBを含むRFP耐性結核状況をおおむね反映していることが示唆された。また、全国から集計された大規模な結核菌サンプル(1997~1999年)を対象としている阿部らのLiPAの検討¹⁹⁾では、RFP耐性結核菌に高頻度に変異が見られたコドンはSer-531(54.4%)、His-526(7.8%)、Asp-516(10.7%)であったが、3.9%の株にはhot spot領域の変異が認められなかったという。今回のRFP耐性結核菌の分離頻度はコドン531変異が62.9%、526変異が8.6%、516変異とhot spot領域以外の変異は0%であった。これら変異出現頻度の変化について、もちろん地域差を考慮する必要があるが、菌の適応度(フィットネス)を低下させる結核菌の薬剤耐性獲得の性質から、適応にはらう犠牲(フィットネス・コスト)を最小限に抑えられる菌株が耐性結核として優勢に出現するという考え²⁰⁾にも注目すべきであろう。特にRFPの*rpoB*コドン531の変異はINH耐性北京型結核菌における*katG*のコドン315の変異とともに、他の突然変異に比べフィットネス・コストの低い変異である²¹⁾。当センターで分離される結核菌の80%以上が北京型結核菌であり²²⁾、しかもMDR-TBの*rpoB*コドン531の変異ならびに*katG*のコドン315の変異を有する菌株が優勢である²³⁾ことから、今後引き続き耐性遺伝子変異の出現頻度を追跡する必要があると考える。したがって、LiPAの継続的な運用はRFP耐性遺伝子変異の出現頻度の把握と耐性結核状況を推測するうえで有用である。

まとめ

当センターにおける4年間のLiPA使用状況から、同キットの高い実用性とRFP耐性結核状況の推測が示唆された。

謝辞 本研究にあたり、当センター臨床研究センター 露口一成部長、同臨床検査科 小池由紀子氏、神戸市環境保健研究所 岩本朋忠博士に深謝いたします。

す。

利益相反：本論文の研究内容、結論、意義、あるいは意見について他者との利益相反(conflict of interest)はありません。

文 献

- 1) 厚生労働省. 結核の統計2010年版. 2010. 財団法人結核予防会, 東京.
- 2) Tuberculosis Research Committee (Ryoken). 2007. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: A nationwide survey, 2002. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 11: 1129-1135.
- 3) World Health Organization. 2010. Global tuberculosis control report 2010. World health organization. Geneva.
- 4) Cavusoglu, C., S. Hilmioğlu, S. Guneri, et al. 2002. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. J. Clin. Microbiol. 40: 4435-4438.
- 5) Cooksey, R. C., G. P. Morlock, S. Glickman, et al. 1997. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. J. Clin. Microbiol. 35: 1281-1283.
- 6) Hirano, K., C. Abe, M. Takahashi. 1999. Mutations of *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J. Clin. Microbiol. 37: 2663-2666.
- 7) Rossau, R., H. Traore, H. de Beenhouwer, et al. 1997. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2093-2098.
- 8) Tortoli, E., F. Marcelli. 2007. Use of the INNO LiPA Rif. TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26: 51-55.
- 9) 稲垣孝行, 八木哲也, 市川和哉, 他. 2010. Line Probe Assay によるRifampicin耐性遺伝子検査の有用性: 患者喀痰を供試しての検討. 結核85: 703-709.
- 10) Wobeser, W. L., M. Krajden, J. Conly, et al. 1996.

- Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 34: 134–139.
- 11) Bergmann, J. S., G. L. Woods. 1996. Clinical evaluation of the Roche AMPLICOR PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens. J. Clin. Microbiol. 34: 1083–1085.
 - 12) 富田元久, 木下幸保, 吉川裕之, 他. 2011. 結核菌群と非結核性抗酸菌群との混在を証明するPNB法 (PNBA) の評価. 医学検査60: 97–100.
 - 13) Kim, B. J., S. H. Lee, M. A. Lyu, et al. 1999. Identification of mycobacterial species by comparative Sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J. Clin. Microbiol. 37: 1714–1720.
 - 14) Jin, D. J., C. A. Gross. 1988. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. J. Mol. Biol. 5: 45–58.
 - 15) Bártfai, Z., A. Somoskövi, C. Ködmön, et al. 2001. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. J. Clin. Microbiol. 39: 3736–3739.
 - 16) Musser, J. M. 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic insights. Clin. Microbiol. Rev. 8: 496–514.
 - 17) Matsiota-Bernard, P., G. Vrioni, E. Marinis. 1998. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. J. Clin. Microbiol. 36: 20–23.
 - 18) The World Health Organization. 2008. WHO/IUATLD Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Report No.4. WHO/HTM/TB/2008.394: Annex 1.
 - 19) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他. 2000. Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出. 結核75: 573–581.
 - 20) Gagneux, S., C. D. Long, P. M. Small, et al. 2006. The Competitive Cost of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Science 312: 1944–1946.
 - 21) Gagneux, S. 2009. Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Microbiol. Infect. 15: 66–68.
 - 22) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 他. 2007. 結核菌の分子疫学的解析—多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較. 結核82: 531–538.
 - 23) Iwamoto, T., S. Yoshida, K. Suzuki, et al. 2009. Population structure analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 3805–3809.

Comprehensive Evaluation of a Line Probe Assay Kit for Rapid Detection of Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical Performance and Inference of Infection Occurrences

Shiomi Yoshida,^{1),*} Motohisa Tomita,²⁾ Mika Kihara,²⁾ Hiroyuki Kikkawa³⁾

¹⁾Clinical Research Center, ²⁾Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku Sakai, Osaka 591–8555; ^{*}Corresponding author

³⁾Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Toneyama Hospital, 5–1–1 Toneyama, Toyonaka, Osaka 560–8552

We evaluated a line probe assay (LiPA) kit, which was designed to identify *Mycobacterium tuberculosis* complex, and to detect mutations related to resistance to rifampicin for rapid detection of MDR-TB. A total of 750 clinical specimens from pulmonary and extrapulmonary sites were tested with LiPA directly and drug-susceptibility testing. Sequence in *rpoB* gene was also performed to 27 clinical isolates with both isoniazid- and rifampicin-resistance, and the LiPA could detect rifampicin-resistant TB in 35 specimens. Compared with results of LiPA, drug susceptibility testing and *rpoB* sequence, several discordant results were observed in 2 rifampicin mono-resistance TB strains and 2 MDR-TB strains with

rpoB mutations. The LiPA was more than just useful for the detection of MDR-TB from variable clinical specimens, although the LiPA caused rare nonspecific reactions as the appropriate situations or correct operations. It may provide clinical managements and summarize the evidence of molecular epidemiology of rifampicin-resistant TB.